

1/9/1

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI
(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

010643408

WPI Acc No: 1996-140362/199615

XRAM Acc No: C96-044155

XRPX Acc No: N96-117557

Detecting tumour specific mRNA by conversion to cDNA and amplification -
provides early, sensitive and specific diagnosis and monitoring, partic.
by analysis of blood or sputum

Patent Assignee: DEUT KREBSFORSCHUNGSZENTRUM (DEKR-N)

Inventor: LACROIX J; VON KNEBEL DOEBERITZ M; WOERNER S

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
DE 4431174	A1	19960307	DE 4431174	A	19940901	199615 B

Priority Applications (No Type Date): DE 4431174 A 19940901

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
DE 4431174	A1		4 C12Q-001/68	

Abstract (Basic): DE 4431174 A

Tumour specific mRNA (I) is detected in a biological sample by: (1) taking and processing the sample; (2) isolating (I) from it; (3) converting (I) to cDNA (II); (4) amplification of (II) by PCR, using tumour specific primers (III), then (5) detection of amplified DNA.

USE - The method is used to screen for and monitor tumours and metastases, e.g. small cell lung, cervical, colonic, hepatic, brain, breast or thyroid carcinomas.

ADVANTAGE - This method can detect very small numbers of tumour cells, is simple, specific and sensitive. It is universally applicable and allows tumours (or tumour recurrence) to be detected at a very early stage, providing better control of treatment.

Dwg.0/0

Title Terms: DETECT; TUMOUR; SPECIFIC; MRNA; CONVERT; CDNA; AMPLIFY; EARLY; SENSITIVE; SPECIFIC; DIAGNOSE; MONITOR; ANALYSE; BLOOD; SPUTUM

Derwent Class: B04; D16; S03

International Patent Class (Main): C12Q-001/68

International Patent Class (Additional): G01N-033/68

File Segment: CPI; EPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-B04D5; B04-B04G; B04-E01; B11-C08E5; B12-K04A1; D05-H09; D05-H18B

Manual Codes (EPI/S-X): S03-E14H

Chemical Fragment Codes (M1):

01 M423 M760 M903 N102 Q233 V600 V613 V614 V615 V632 V633 V634

02 M423 M750 M903 N102 Q233 V753

Chemical Fragment Codes (M6):

03 M903 P831 Q233 R513 R521 R611 R612 R613 R626 R639

19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

12 **Offenlegungsschrift**
10 **DE 44 31 174 A 1**

51 Int. Cl.⁶:
C 12 Q 1/68
G 01 N 33/68

21 Aktenzeichen: P 44 31 174.5
22 Anmeldetag: 1. 9. 94
43 Offenlegungstag: 7. 3. 96

DE 44 31 174 A 1

71 Anmelder:
Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des
öffentlichen Rechts, 69120 Heidelberg, DE

74 Vertreter:
Müller-Boré & Partner, 81671 München

72 Erfinder:
Knebel Döberitz, Magnust von, Dr., 69118
Heidelberg, DE; Wörner, Stefan, 69118 Mannheim,
DE; LaCroix, Jeaninne, 69123 Mannheim, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Nachweisverfahren für tumorspezifische mRNA

57 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum
Nachweis von tumorspezifischer mRNA in einer Körperpro-
be, das folgende Verfahrensschritte umfaßt:

- (a) Entnahme und Aufbereitung einer Körperprobe,
 - (b) Isolierung von mRNA aus der Körperprobe von (a),
 - (c) Übersetzung der mRNA von (b) in cDNA,
 - (d) Amplifikation der cDNA von (c) durch eine PCR-Reaktion
mit Tumormarker-spezifischen Primern, und
 - (e) Nachweis der amplifizierten cDNA von (d).
- Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung eines solchen
Verfahrens.

DE 44 31 174 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von tumorspezifischer mRNA und seine Verwendung.

Bei der Krebsvorsorge und der Therapiekontrolle nach aufgetretenen Krebserkrankungen geht es um den Nachweis von Tumorzellen. Bis jetzt wurde dies mit zytologischen, radiologischen oder serologischen Methoden durchgeführt. Diese Methoden haben aber allgemein den Nachteil, daß die Proben, die auf Tumorzellen getestet werden sollen, oft nur schwer zu erhalten sind und die Ergebnisse wegen geringer Sensitivität und Spezifität des Verfahrens nur bei Proben mit vielen Tumorzellen verlässlich sind. Dies ist aber ein deutlicher Nachteil, wenn es um den Nachweis geringster Mengen von Tumorzellen geht.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem auch geringste Mengen von Tumorzellen im Rahmen der Krebsvorsorge und/oder Therapiekontrolle bei Krebserkrankungen nachweisbar sind.

Erfindungsgemäß wird dies durch ein Verfahren erreicht, mit dem tumorspezifische mRNA in Körperproben nachgewiesen wird. Ein solches Verfahren umfaßt folgende Verfahrensschritte

- (a) Entnahme und Aufbereitung einer Körperprobe,
- (b) Isolierung von mRNA aus der Körperprobe von (a),
- (c) Übersetzung der mRNA von (b) in cDNA,
- (d) Amplifikation der cDNA von (c) durch eine PCR-Reaktion mit Tumormarker-spezifischen Primern, und
- (e) Nachweis der amplifizierten cDNA von (d).

Dem erfindungsgemäßen Verfahren liegt die Idee zugrunde, daß durch den Nachweis spezifischer mRNA, die nur in Tumorzellen, nicht aber in normalen Körperzellen, vorkommt, direkt auf das Vorliegen von Tumorzellen geschlossen werden kann. Eine solche mRNA ist z. B. eine "aberrant gespleißte" mRNA oder eine, die für einen Tumormarker, z. B. CEA, NSE, etc. kodiert. Diese mRNA kann nach reverser Transkription in cDNA durch geeignete Primer in einer PCR-Reaktion amplifiziert werden und durch Southernblot-Hybridisierung nachgewiesen werden.

Eine Körperprobe, in der eine tumorspezifische mRNA nachgewiesen werden soll, wird dem Patienten entnommen. Geeignet sind hierzu u. a. Blut, Sputum, Urin, Stuhl, Liquor, Galle, gastrointestinale Sekrete, Biopsien bzw. Organpunktate und Lympflüssigkeit, wobei Blut und Sputum bevorzugt sind.

Für eine Blutprobe wird vorzugsweise ca. 10 ml Blut, aus der Armvene des Patienten entnommen. Dieses Blut wird in mit gerinnungshemmenden Agentien versehene Blutröhrchen gegeben und kann bis zur Gewinnung der PBL/Tumorzellen kurz, maximal 4—7 h bei 4°C gelagert werden. Die Extraktion der PBL/Tumorzellen kann nach bekannten Verfahren erfolgen, vorzugsweise durch Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Paque (Pharmacia) gemäß einem Standardprotokoll für Lymphozytenextraktion. Anschließend wird das Zellpellet schockgefroren und bei -70°C aufbewahrt.

Für eine Sputumprobe wird der Patient 20 bis 30 min einer Inhalation mit vernebelter, physiologischer Kochsalzlösung ausgesetzt, bevor ca. 5 ml Sputum abgenommen werden. Diese kann bis zu seiner Aufarbeitung kurz, maximal 4—7 h, bei 4°C gelagert werden. Die Aufarbeitung der Sputumprobe erfolgt in ca. 20 ml einer 20 mM DTT-Lösung, wozu das verwendete Gefäß, vorzugsweise ein 50 ml Falcon-Röhrchen, 30 min bei 4°C in einen Over-head-turner gestellt wird. Dann erfolgt eine Zentrifugation der Probe für ca. 15 min bei 300 xg und 4°C. Es schließt sich ein Waschschritt mit kaltem PBS und nochmaliger Zentrifugation unter vorstehenden Bedingungen an. Das gewonnene Zellpellet wird in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C aufbewahrt.

Aus vorstehenden Zellpellets wird Gesamt-RNA isoliert, wobei mRNA besonders angereichert wird. Hierzu können übliche Verfahren verwendet werden. Günstig ist es, den käuflichen Guanidinium-Isothiocyanat-Extraktionskit (GlassMax, Gibco BRL) zu verwenden.

Die angereicherte mRNA wird dann einer unspezifischen, reversen Transkription unterzogen, wobei hierfür übliche Oligonukleotide, vorzugsweise Hexanukleotide (erhältlich z. B. bei Boehringer Mannheim) und eine MMLV-reverse Transkriptase (z. B. SUPERSKRIPT II, erhältlich bei Gibco BRL) verwendet werden. Ein bevorzugter Reaktionsansatz mit Hexanukleotiden wird 10 min bei 65°C und 60 min bei 37°C inkubiert. Hierdurch wird die mRNA in cDNA übersetzt.

Die erhaltene cDNA wird einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR-Reaktion) unterworfen, wobei eine Taq-Polymerase (erhältlich z. B. bei Gibco BRL) verwendet wird. Als Primer werden Oligonukleotide verwendet, deren Sequenzen entsprechend bekannter DNA- und/oder RNA-Sequenzen von tumorspezifischen Transkripten ausgewählt werden, u. a. mRNA, die für sogenannte Tumormarker kodieren. Beispielsweise werden folgende Primer eingesetzt:

60 Primer für NSE:
nse255.forward: GCA AGA GAA GCT GGA CAA CC
nse944.reverse: ACA ATC TGG ATC CCT ACA TTG G
Primer für HPV 16:
16forward: ACT GCA ATG TTT CAG GAC CC
65 16reverse: CAT GCA TGA TTA CAG CTG GG
Primer für HPV 18:
18forward: ACA ATA CTA TGG CGC GCT TT
18reverse: AGC ACG AAT GGC ACT GG

Die Bedingungen für die PCR-Reaktion entsprechen den üblichen Standardbedingungen. Insbesondere wird die Reaktion wie folgt durchgeführt:

1,5 U Polymerase pro Ansatz;
1,5 min, 93°C;
35 × 30 sec, 93°C;
30 sec, Annealingtemperatur, entsprechend des Primerpaares;
30–60 sec, 72°C, entsprechend der Fragmentlänge;
6 min, 72°C.

Die Annealingtemperatur liegt z. B. für NSE und GAPDH bei ca. 60°C und für HPV 16/18 bei ca. 56°C.

Zur Kontrolle vorstehender Anreicherung von mRNA und deren Übersetzung in cDNA empfiehlt es sich, eine GAPDH-PCR-Reaktion durchzuführen. Diese erfolgt unter den vorstehenden Bedingungen. Als Primer werden z. B. verwendet:

Primer für GAPDH:
gapdh1forward: CAT CTC TGC CCC CTC TGC TGA
gapdh2reverse: GGA TGA CCT TGC CCA CAG CCT

Die vorstehende amplifizierte DNA wird in üblicher Weise nachgewiesen. Günstig ist es, sie auf einem Agarosegel, vorzugsweise 13–1,5%, aufzutrennen, mit Ethidiumbromid anzufärben und einer Southern Blot-Hybridisierung zu unterziehen. Hierzu wird die DNA auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und mit einem, z. B. ³²P-5'-End-markierten Oligonukleotid hybridisiert, wobei das Oligonukleotid spezifisch für den durch das vorstehende Primerpaar festgelegten Tumormarker bzw. GAPDH ist. Das erhaltene Ergebnis gibt Aufschluß darüber, ob die Körperprobe Tumorzellen aufweist, die den speziellen Tumormarker exprimieren.

Als Hybridisierungsnukleotide eignen sich

für NSE: AAC AAG CTG GCC ATG CAG
und für GAPDH: CTC TCC AGA ACA TCA TCC CTG

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich insbesondere, folgendes nachzuweisen:

kleinzelliges Bronchialkarzinom/u. a. NSE-mRNA, Synaptophysin-mRNA, Gastrin-Releasing-Peptide-mRNA, u. a. aus Sputum, Blut oder Organpunkaten/Tumor- bzw. Metastasensuche;
Zervix-Karzinom/u. a. HPV 16/18-mRNA aus Blut- oder Lymphknoten/Tumor- bzw. Metastasensuche;
Kolon-Karzinom/u. a. CEA-mRNA aus Stuhl, Blut oder Lymphknoten/Tumor- bzw. Metastasensuche;
Leberzell-Karzinom/u. a. α-Fetoprotein-mRNA aus Galle oder Blut/Tumor- bzw. Metastasensuche;
Gehirn-Karzinom/u. a. NSE-mRNA oder Synaptophysin-mRNA aus Liquor oder Blut/Tumor- bzw. Metastasensuche;
Mammakarzinom/u. a. CEA-mRNA aus Blut oder Lymphknoten/Tumor- bzw. Metastasensuche; und
Schilddrüsenkarzinom/u. a. Thyroxin-mRNA aus Urin oder Blut/Tumor- bzw. Metastasensuche.

Wird das erfindungsgemäße Verfahren für diagnostische Zwecke eingesetzt, werden verschiedene Tumormarker-spezifische Primer nacheinander verwendet und abhängig davon, welche cDNA amplifiziert werden konnte, können Rückschlüsse darauf gezogen werden, wo der Patient Krebs hat bzw. ob überhaupt. Um eine diagnostische Breite des erfindungsgemäßen Verfahrens zu erlauben, ist das Verfahren nicht auf die vorn angegebenen speziellen mRNAs und die dazugehörigen Primer beschränkt.

Das erfindungsgemäße Verfahren zeichnet sich dadurch aus, daß der Nachweis von geringsten Mengen an Tumorzellen auf sehr einfache Weise spezifisch und sensitiv gelingt. Das Verfahren ist universell einsetzbar und nicht auf bestimmte Tumoren beschränkt. Krebsvorsorgemaßnahmen werden dadurch schon im frühesten Tumorstadium ermöglicht. Therapieverfahren können früher eingeleitet werden und Tumorrezidive früher erfaßt werden. Schon durchgeführte Therapieverfahren können besser kontrolliert werden und dem Patienten bleibt möglicherweise eine weitergehende Behandlung erspart.

Die vorliegende Erfindung wird durch das folgende Beispiel erläutert.

Beispiel

Nachweis von Zervix-Karzinom-spezifischer mRNA aus Blut

Einer an Zervix-Karzinom erkrankten Person wurden 10 ml Blut aus der Armvene entnommen. Dieses Blut wurde in mit EDTA versehene Blutröhrchen gegeben und 6 h bei 4°C gelagert. PBL/Tumorzellen wurden durch eine Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Paque gemäß einem Standardprotokoll für Lymphozytenextraktion extrahiert. Das Zellpellet wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –70°C aufbewahrt.

Aus dem Zellpellet wurde Gesamt-RNA isoliert, wobei mRNA angereichert wurde. Hierzu wurde der käufliche Guanidinium-Isocyanat-Extraktionskit verwendet.

Die angereicherte mRNA wurde einer unspezifischen, reversen Transkription unterzogen, wobei käufliche Hexanukleotide und eine MMLV-reverse Transkriptase verwendet wurden. Der Reaktionsansatz wurde 10 min bei 65°C und 60 min bei 37°C inkubiert. Es wurde cDNA erhalten.

Die cDNA wurde einer PCR-Reaktion unterzogen. Hierzu wurden eine Taq-Polymerase und folgende Primer verwendet:

Primer für HPV 16:

5 16forward: ACT GCA ATG TTT CAG GAC CC

16reverse: CAT GCA TGA TTA CAG CTG GG

Primer für HPV 18

18forward: ACA ATA CTA TGG CGC GCT TT

18reverse: AGC ACG AAT GGC ACT GG

10

Die PCR-Reaktion wurde wie folgt durchgeführt:

1,5 U-Taq-Polymerase pro Ansatz;

1,5 min, 93°C;

15 35 × 30 sec, 93°C;

30 sec, 56°C Annealingtemperatur;

30 sec, 72°C; und

6 min, 72°C.

20

Zur Kontrolle wurde vorstehende cDNA auch einer GAPDH-PCR-Reaktion unterzogen. Diese wurde unter den vorstehenden Bedingungen durchgeführt, wobei als Primer verwendet wurden:

Primer für GAPDH:

gapdh1forward: CAT CTC TGC CCC CTC TGC TGA

25 gapdh2reverse: GGA TGA CCT TGC CCA CAG CCT

Die amplifizierte DNA wurde auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Die DNA wurde dann auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und mit folgenden ³²P-5'-End-markierten Oligonukleotiden getrennt hybridisiert. Die Hybridisierungstemperatur lag jeweils 5°C unter der Schmelztemperatur des verwendeten Oligonukletids.

30

Folgende Oligonukleotide wurden verwendet:

Für HPV 16: TAT AGT TGT TTG CAG CTC TGT

Für HPV 18: CAA TAC TGT CTT GCA ATA TAC

35 Für GAPDH: CTC TCC AGA ACA TCA TCC CTG

Mit den verwendeten Oligonukleotiden konnte jeweils eine amplifizierte DNA nachgewiesen werden.

Patentansprüche

40

1. Verfahren zum Nachweis von tumorspezifischer mRNA in einer Körperprobe, umfassend die folgenden Verfahrensschritte:

45

(a) Entnahme und Aufbereitung einer Körperprobe,

(b) Isolierung von mRNA aus der Körperprobe von (a),

(c) Übersetzung der mRNA von (b) in cDNA,

(d) Amplifikation der cDNA von (c) durch eine PCR-Reaktion mit Tumormarker-spezifischen Primern, und

(e) Nachweis der amplifizierten cDNA von (d).

50

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Körperprobe Blut, Sputum, Urin, Stuhl, Liquor, Galle, gastrointestinale Sekrete, Organpunktate bzw. Biopsien und/oder Lymphflüssigkeit ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Tumormarker-spezifischen Primer solche für NSE oder HPV 16/18 sind.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Primer für NSE sind:

55

nse255forward: GCA AGA GAA GCT GGA CAA CC

nse944reverse: ACA ATC TGG ATC CCT ACA TTG G

5. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Primer für HPV 16/18 sind:

60

HPV 16:

16forward: ACT GCA ATG TTT CAG GAC CC

16reverse: CAT GCA TGA TTA CAG CTG GG

HPV 18:

18forward: ACA ATA CTA TGG CGC GCT TT

65

18reverse: AGC ACG AAT GGC ACT GG

6. Verwendung des Verfahren nach einem der Ansprüche 1–5 zur Tumor- bzw. Metastasensuche in der Krebsvorsorge und -Nachsorge.